

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08164

研究課題名(和文) microRNAを標的としたNUT正中線がんの新たな治療法の開発

研究課題名(英文) microRNA analysis in NUT midline carcinoma

研究代表者

奥村 俊介 (Okumura, Shunsuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：10516339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナットミッドラインカルシノーマは、稀ではあるが悪性度が極めて高い予後不良な悪性腫瘍である。根治不可能な進行癌として発見されることが多いが、有効で確立された治療法がない。本研究ではナットミッドラインカルシノーマの新たな治療標的としてmicroRNAを解析した。我々が行なったmicroRNAの解析結果から、miR-21というmicroRNAが治療標的の候補として同定された。細胞株を使った実験でmiR-21の機能評価を行ったところ、miR-21の阻害剤がナットミッドラインカルシノーマに有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ナットミッドラインカルシノーマに対する有効な治療薬が無いが、我々が行った研究の結果、miR-21阻害剤がナットミッドラインカルシノーマに対して有効な治療薬である可能性が示された。今後、前臨床試験でこの阻害剤の効果をさらに評価することにより、予後不良な疾患であるナットミッドラインカルシノーマの新たな治療法として臨床応用できる期待がある。

研究成果の概要(英文)：NUT midline carcinoma is a rare but highly malignant tumor with a poor prognosis. It is often found as an incurable advanced cancer, but there is no effective and established treatment. In this study, we analyzed microRNAs as a new therapeutic target for nut midline carcinoma. From the results of our microRNA analysis, a microRNA called miR-21 was identified as a candidate therapeutic target. When the function of miR-21 was evaluated in an experiment using a cell line, an inhibitor of miR-21 was effective for NUT midline carcinoma.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：NUT midline carcinoma

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

NUT midline carcinoma (NMC)は、近年の癌遺伝子検査の進歩によって新たに発見・定義された悪性腫瘍である<sup>1)</sup>。病態は未だに不明で有効な治療法もなく、予後不良な疾患である<sup>2)</sup>。NMCは進行期で見つかることが多いが、従来の抗がん剤治療には抵抗性を示す。また、ターゲット治療薬として BET 阻害剤が評価されているが、耐性が生じてしまう問題がある<sup>3)</sup>。以前より我々はNMCの新たな治療標的を探索する研究を継続していたが、その研究過程でmicroRNA(miRNA)がその病態に関与している可能性を見出し、miRNAをNMCの治療に応用すべく本研究を立ち上げた。

### 2. 研究の目的

NMCの新たな治療標的となるmiRNAを評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1)治療標的となるmicroRNAの探索

コントロールのNMC細胞株(HCC2429, Ty82)およびNUTM1遺伝子をノックダウンしたNMC細胞株からsmall RNAを抽出した(PureLink miRNA isolation kit)。抽出したsmall RNAを用いて、次世代シーケンサーによるmiRNAの発現解析を行なった。ノックダウンにはStealth RNAi siRNAを用い、細胞株へsiRNAを72時間曝露させた。次世代シーケンサーにはIon PGM systemを用いた。発現解析にはCLC Genomics Workbenchソフトを用いた。

#### (2)miRNA機能解析

miRNAのmimicおよびinhibitorを用いて機能解析を行なった。miRCURY LNA mimics, inhibitorを用いた。各々のLipofectamine 3000を用いてmimic, inhibitorを細胞へ導入し、72時間の曝露を行なった。細胞増殖アッセイとしてMTS assayを行なった。

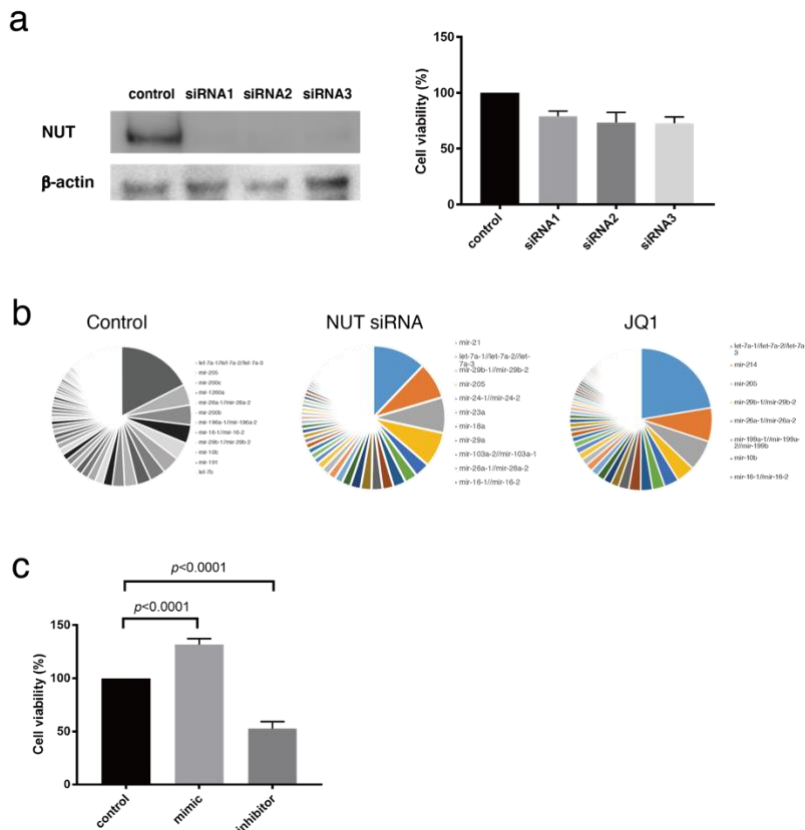
#### (3)miRNAアッセイ

BRD4阻害剤に耐性を持つNMC細胞株からsmall RNAを抽出した。TaqMan MicroRNA assaysを用いて細胞株から抽出したRNAに含まれるmiR-21-5pの発現量を解析した。ハウスキーピングmiRNAとしてRNU48を用いた。PCRにはQuantStudio 3D Digital PCRを用いた。

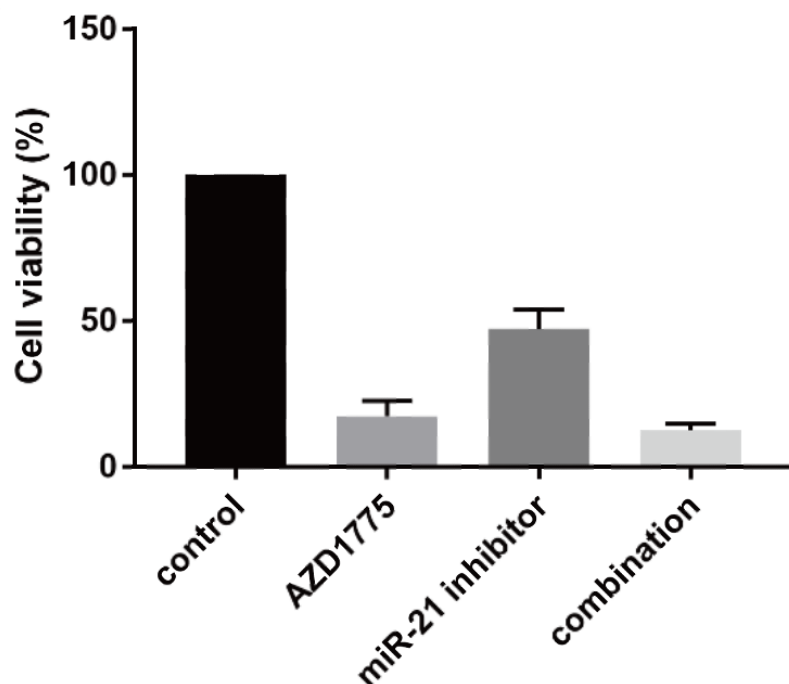
### 4. 研究成果

#### (1)NMCの新たな治療標的としてmiR-21-5pを同定した。

NMC細胞株を用いてRNAシーケンスを行なった。miRNAの発現解析により、miR-21-5pの発現変化を認めた(下図b)。NUT細胞株へmiR-21-5pのmimic, inhibitorを各々投与したところ、miR-21-5pがNMC細胞の増殖を亢進させることが明らかとなった(下図c)。



(2)miR-21-5p 阻害剤が、BRD4 阻害剤耐性 NMC 細胞の増殖を抑制した（下図）。BRD4 阻害剤に耐性を持つ NMC 細胞株へ miR-21-5p の阻害剤を投与したが、miR-21 阻害剤がその細胞増殖を抑制することを突き止めた。さらに、我々の前研究で明らかとなった NMC のもう 1 つの治療薬候補である WEE1 阻害剤 AZD1775 との併用効果も明らかとなった。



(3)以上の研究結果から、我々は NMC における新たな治療ターゲットとして miRNA、特に miR-21 の有用性を見出した。各種癌における miRNA の発現に関する報告はあるものの<sup>4)</sup>、これまで NMC の治療ターゲットとしての miRNA が評価された報告はなく、本研究により新たに miR-21 が治療候補として臨床応用できる可能性が明らかとなった。この研究成果を足がかりとして、将来、臨床応用が進むと、NMC の治療予後が向上する期待がある。NMC の予後は平均で半年程度と言われており、新たな治療法開発により予後が向上することがあれば社会的な意義が大きいと思われる。この研究成果をさらに発展すべく、臨床応用に向けた開発・評価を進めていくこととした。

#### <引用文献>

1. French CA, Miyoshi I, Aster JC, et al.: BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19). *Am J Pathol* 159: 1987-1992, 2001.
2. French CA: NUT Carcinoma: Clinicopathologic features, pathogenesis, and treatment. *Pathol Int* 68: 583-595, 2018.
3. Kurimchak AM, Shelton C, Duncan KE, et al.: Resistance to BET Bromodomain Inhibitors Is Mediated by Kinome Reprogramming in Ovarian Cancer. *Cell Rep* 16: 1273-1286, 2016.
4. Bates SE: Epigenetic Therapies for Cancer. *N Engl J Med* 383: 650-663, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------